

**PEPTIDE-LIPID DERIVATIVE AND LIPOSOME**

**Veröffentlichungsnummer:** JP6219967  
**Veröffentlichungsdatum:** 1994-08-09  
**Erfinder:** ISHIKURA TOYOAKI; others: 06  
**Anmelder:** D D S KENKYUSHO:KK  
**Klassifikation:**  
- Internationale: A61K47/48; A61K9/127; C07K15/12  
- Europäische:  
**Aktenzeichen:** JP19930009290 19930122  
**Prioritätsaktenzeichen:**

**Zusammenfassung von JP6219967**

**PURPOSE:** To provide a new peptide-lipid derivative useful as a metastasis-suppressing substance for cancer cell.

**CONSTITUTION:** A lipid is bonded directly or via a linker to a peptide containing a sequence composed of Arg-Gly-Asp. The total polymerization degree of the amino acids in the peptide is <=20 and the lipid to be used for the production of the peptide-lipid derivative is preferably cholesterol and 8-18C alkyl group. The bonding of the lipid to the peptide containing the Arg-Gly-Asp sequence can be carried out e.g. by reacting an amino group or a carboxyl group of a peptide with a cholesterol derivative or an alkyl group having a functional group capable of forming a covalent bond with the functional group of the peptide. A liposome can be prepared by compounding the peptide-lipid derivative.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-219967

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 47/48 9/127 C 0 7 K 15/12	Z AD Z F	7433-4C 7329-4C 8318-4H		

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全12頁)

(21)出願番号	特願平5-9290	(71)出願人	390031462 株式会社ディ・ディ・エス研究所 東京都渋谷区渋谷2丁目17番5号
(22)出願日	平成5年(1993)1月22日	(72)発明者	石倉 豊昭 千葉県流山市江戸川台東3-1592-33
		(72)発明者	佐々木 淳 茨城県つくば市春日4-19-13
		(72)発明者	長曾 宏 千葉県柏市中央1-8-5
		(72)発明者	村橋 直一 茨城県北相馬郡守谷町松前台7-2-4
		(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ベブチドー脂質誘導体及びリポソーム

(57)【要約】

【目的】 癌細胞の転移抑制物質の提供。

【構成】 Arg-Gly-Aspからなる配列を含む  
ベブチドに、脂質が直接にまたはリンカーを介して結合  
していることを特徴とするベブチドー脂質誘導体、及び  
このような脂質誘導体を有することを特徴とするリポソ  
ーム。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 Arg-Gly-Aspからなる配列を含むペプチドに、脂質が直接にまたはリンカーを介して結合していることを特徴とするペプチド-脂質誘導体。

【請求項2】 脂質が炭素原子数8～18のアルキル基である請求項1記載のペプチド-脂質誘導体。

【請求項3】 請求項1記載のペプチド-脂質誘導体を有することを特徴とするリポソーム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、Arg-Gly-Aspからなる配列を有するペプチドに、脂質が直接にまたはリンカーを介して結合していることを特徴とするペプチド-脂質誘導体、及びこの誘導体を有するリポソームに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 Arg-Gly-Asp配列(RGD配列)は、細胞表面に存在する接着分子であるインテグリンをリセプターとするフィプロネクチン等のリガンド中に存在し、インテグリンの一部はこのRGD配列を認識してこれと結合することが知られている(Pierschbacher, M.D., et al., Nature, 309, 30～33 (1984))。

【0003】 このことより、外から与えられたRGD配列を含むペプチド(RGDペプチド)はフィプロネクチンと競合して例えば癌細胞に結合し、その結果、フィプロネクチンによる細胞間接着等を阻害すると考えられる。実際、RGD配列が癌細胞の転移を抑制することが観察されている(Humphries M.J., et al., Science, 233, 467 (1986))。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 そこで本発明者は、フィプロネクチンと拮抗的にインテグリンに結合し、かつ、RGDペプチドより、より強く癌細胞表面インテグリンに結合する物質を見つければ、より強く癌細胞の転移を抑制できると考えた。即ち、本発明は癌細胞の転移抑制物質を提供しようとするものである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、リポソーム表面にRGDペプチドを多数存在せしめれば、そのリポソーム表面の複数のRGD配列に癌細胞が結合することにより、RGDペプチド単独よりもより強く癌細胞に結合するのではないかと考え、表面にRGDペプチドを有するリポソームを得ようとした。

【0006】 そこで、RGDペプチドの脂質誘導体(RGDペプチド-脂質誘導体)を用いてリポソームを調製したところ、表面にRGDペプチドを有するリポソームを調製することができた。

【0007】 すなわち、本発明は、RGDペプチドに脂質が直接にまたはリンカーを介して結合していることを特徴とするペプチド-脂質誘導体、及びこのようなペ

2

チド-脂質誘導体を有することを特徴とするリポソームに関する。

【0008】 以下、本発明を逐次詳細に説明する。

【0009】 先ず、本発明のペプチド-脂質誘導体は新規物質であるので、その製造法とともにこれを説明する。

【0010】 RGDペプチドは、先述のようにRGD配列を含むペプチドの略称であって、RGD配列を含むペプチドであれば全てこれに包含される。従って、RGDペプチドは、RGD配列のみからなるペプチドでもよく、また、RGD配列とそのC-末端またはN-末端に結合したアミノ酸またはペプチドとかなるペプチドでもよく、更にはRGD配列がペプチド鎖のC-末端又はN-末端以外の場所にあっても良い。

【0011】 RGDペプチドの全体のアミノ酸の重合度は、20以下とするのが合成上便利である。

【0012】 RGDペプチドに結合させてペプチド-脂質誘導体を得るために用いられる脂質としては、コレステロール及び炭素原子数8～18のアルキル基が好適である。脂質がアルキル基であるときは、直鎖アルキル基であっても、分枝状アルキル基であってもよい。更に、2個以上の直鎖アルキル基が、グルタミン酸、エチレンジアミン等の2個以上の官能基を有するリンカーに接続して分枝状となっていてもよい。

【0013】 RGDペプチドに脂質を結合させる方法としては、例えば、ペプチドのアミノ基またはカルボキシル基に、これらRGDペプチドの官能基と共有結合を形成しうる官能基を有するようにしたコレステロール誘導体またはアルキル基を反応せしめて、RGDペプチドに脂質を直接結合させる方法を挙げることができる。また、エタノールアミン、 $\gamma$ -アミノ酸、コハク酸等のリンカーを介して、RGDペプチドに脂質を導入しても良い。

【0014】 これを詳述するに、例えばコレステロールをRGDペプチドのN-末端に導入するには、コレステロールをその水酸基を利用してカルボニル誘導体として、ウレタン結合またはウレア結合によりN-末端に導入することができる。また、このコレステロールのカルボニル誘導体はリジンのアミノ基の一方と反応せしめた後、もう一方のアミノ基を利用してRGDペプチドのC-末端に連結することもできる。更に、C-末端への導入については、コレステロールの水酸基を利用して直接にC-末端に繋げることもできる。

【0015】 また、アルキル基を脂質として用いる場合には、長鎖脂肪酸のカルボキシル基とRGDペプチドの末端アミノ基またはリジンの $\epsilon$ -アミノ基とを反応せしめて結合せしめることができる。また、RGDペプチドをその末端カルボキシル基またはグルタミン酸の $\gamma$ -カルボキシル基を介してアルキル基と繋ぐには、カルボキシル基と反応しうる例えば水酸基、アミノ基等の官能基

3

を導入したアルキル基とこれらカルボキシル基とを反応せしめればよい。RGDペプチドとアルキル脂質との間に重合度2~6のポリエチレングリコールをスペーサーとして導入した方がよい場合がある。

【0016】上記のように、予め調製したRGDペプチドにアルキル基を導入することもできるが、固相法または液相法にてアミノ酸を順次繋げてゆく段階でアルキル基を導入してもよい。例えば、コレステロールの活性エステルに液相法にてカルボキシル基を保護したアミノ酸を順次繋げてもよいし、または、アミノ酸のカルボキシル基を固相担体に固定し、これにアミノ基を保護したアミノ酸を順次繋げてもよい。

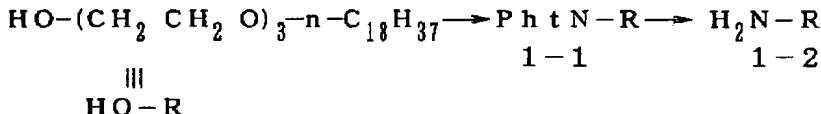
【0017】次に、本発明のリポソームについて説明する。

【0018】上述のようにして得た本発明のペプチドー脂質誘導体を用いてリポソームを調製するには、特別の制限はなく、それ自体公知の方法に準ずることができる。

【0019】本発明のリポソームは、上述した本発明の物質であるRGDペプチドー脂質誘導体を配合して得られるリポソームであって、該物質の特定の性質を専ら利用する物である。

【0020】このリポソームを調製するには、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミン等の脂質やジアルキル型合成界面活性剤\*

スキーム I a



【0025】

4

\*等の膜成分物質と本発明の物質とを予め混合し、これを公知の方法(Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9, 467 (1980))に従いリポソームの分散液を調製する。かかるリポソームは、膜安定化剤としてコレステロール等のステロール類、ジアルキルリン酸、ステアリルアミン等の荷電物質およびトコフェロール等の酸化防止剤を含んでいてよい。

【0021】

【実施例】以下実施例により本発明を更に説明する。

【0022】実施例1 (RGDペプチドー脂質誘導体の合成(その1))

本実施例においては、脂質(アンカー)がアルキル基であり、スペーサーとして重合度が3のポリエチレングリコールを有するRGDペプチドー脂質誘導体を合成した。

【0023】すなわち、目的化合物を、スペーサー・アンカ一部(下記スキームI aにおけるHO-R)からアミノ酸残基を1個ずつ伸長させ、得られた保護体をトリフルオロ酢酸(TFA)または弗化水素(HF)によって脱保護する方法で合成した。基本的には古典的なペプチド合成法(液相法)によるものである。合成の概略は、下記スキームI a~I dの通りである。

【0024】

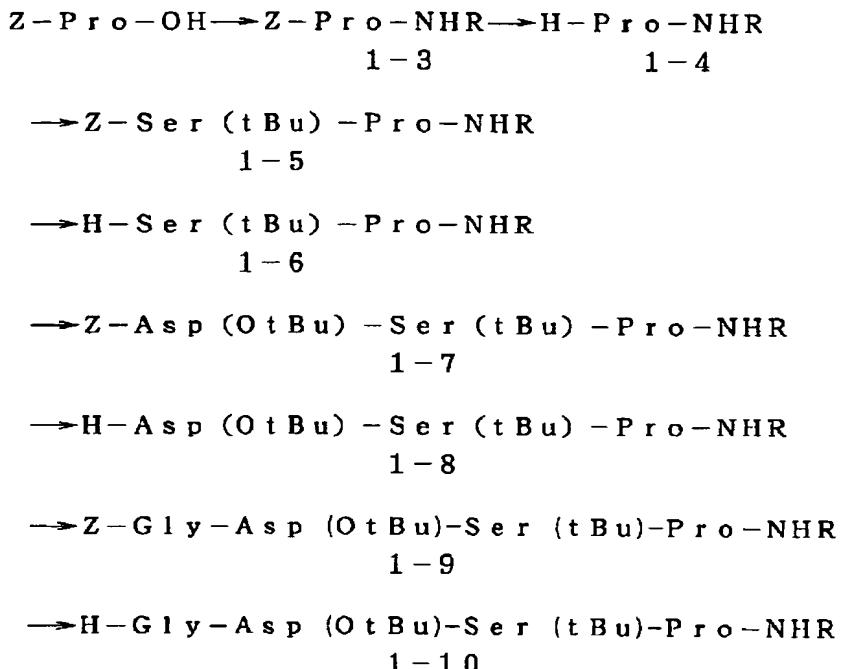
【化1】

【化2】

5

6

## スキーム I b



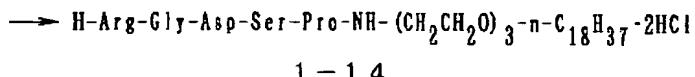
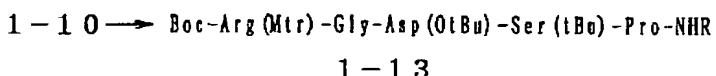
【0026】

\* \* 【化3】

## スキーム I c



1-12  
※ ※ 【化4】  
スキーム I d



【0028】(a) 化合物1-1の合成

トリエチレングリコールモノn-オクタデシルエーテル11.023g、フタル酸無水物4.239g及びトリフェニルホスフィン8.616gをテトラヒドロフラン(THF)150mlに溶かし、氷冷下攪拌した。ここにジエチルアゾジカルボキシレート5.17mlを加え、そのまま22時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し(酢酸エチル:n-ヘキサン4:1)、無色非晶質物50

13.684gを得た。

【0029】NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H), 1.25(br s, 30H), 1.53-1.56(m, 2H), 3.41(t, 2H, J=6.8Hz), 3.50-3.52(m, 2H), 3.57-3.62(m, 4H), 3.64-3.66(m, 2H), 3.74(t, 2H, J=5.9Hz), 3.90(t, 2H, J=5.9Hz), 7.70-7.72(m, 2H), 7.84-7.85(m, 2H)。

【0030】(b) 化合物1-2の合成

化合物1-1、13.684gにエタノール130ml及びヒドラジン-水和物2.50mlを加えて加熱還流

下で4.5時間攪拌した。放冷した後氷冷し、析出した結晶を濾去した。溶媒を減圧下留去し、残渣をクロロホルム-2N水酸化ナトリウム間に分配させ、有機層を分離した。水層をクロロホルム抽出し、抽出液を合わせて飽和食塩水で洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させた。溶媒を減圧下留去し、無色非晶質物10.073gを得た。

【0031】 NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=7.0Hz), 1.25(br s, 30H), 1.55-1.60(m, 2H), 2.86(t, 2H, J=5.2Hz), 3.45(t, 2H, J=6.7Hz), 3.51(t, 2H, J=5.2Hz), 3.58-3.60(m, 2H), 3.63-3.68(m, 6H)。

【0032】 (c) 化合物1-3の合成

N-ベンジルオキシカルボニルプロリン2.549g、化合物1-2、3.774g及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1.524gをN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)50m1とTHF30m1との混合物に溶かし、氷冷下攪拌した。ここにN,N'-ジシクロヘキシリカルボジimid(DCC)2.036gを加え、そのまま23時間攪拌した。生じた沈殿を濾去し、溶媒を減圧下留去し、残渣を酢酸エチルに溶かし、10%クエン酸、10%炭酸ナトリウム及び飽和食塩水でこの順に洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し(塩化メチレン→塩化メチレン:メタノール100:1~70:1)、淡黄色粘稠の油状物4.731gを得た。

【0033】  $[\alpha]_D^{22} = -17.8^\circ$  (c=1.08, EtOH)。

NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=7.0Hz), 1.25(br s, 30H), 1.55-1.60(m, 4H), 1.84-2.01(br d, 2H), 2.06-2.32(br d, 2H), 3.38-3.66(m, 12H), 3.43(t, 2H, J=6.8Hz), 4.32(br s, 1H), 5.11(d, 1H, J=12.5Hz), 5.18(d, 1H, J=12.5Hz), 6.46(br s, 0.47H), 6.90(br s, 0.53H), 7.36(br s, 5H)。

【0034】 (d) 化合物1-4の合成

化合物1-3、4.640gにメタノール80m1を加えて溶かした。ここに触媒として10%Pd-C(dry)0.20gを加え、常圧水素雰囲気下で2時間攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を減圧下留去して無色非晶質物3.632gを得た。

【0035】 NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=6.8Hz), 1.25(br s, 30H), 1.55-1.60(m, 2H), 1.64-1.76(m, 2H), 1.84-1.94(m, 2H), 2.09-2.16(m, 1H), 2.88-2.93(m, 1H), 2.97-3.02(m, 1H), 3.38-3.50(m, 4H), 3.55-3.59(m, 4H), 3.61-3.67(m, 6H), 3.72(dd, 1H, J=5.5Hz, 9.0Hz), 7.84(br s, 1H)。

【0036】 (e) 化合物1-5の合成

N-ベンジルオキシカルボニル-O-t-ブチルセリン2.354g、化合物1-4、3.614g及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1.175gをDMF25m1に溶かし、氷冷下攪拌した。ここにDCC1.71

9gを加え、そのまま11時間攪拌し、生じた沈殿を濾去し、溶媒を減圧下留去した。残渣を酢酸エチルに溶かし、10%クエン酸、10%炭酸ナトリウム及び飽和食塩水でこの順に洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し(塩化メチレン→塩化メチレン:メタノール100:1~70:1)、淡黄色粘稠の油状物4.731gを得た。

【0037】  $[\alpha]_D^{22} = -25.3^\circ$  (c=1.17, EtOH)。

NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=6.8Hz), 1.18(s, 9H), 1.25(brs, 30H), 1.54-1.60(m, 2H), 1.99(m, 3H), 2.26(m, 1H), 3.27-3.33(m, 1H), 3.43-3.63(m, 15H), 3.68-3.71(m, 1H), 3.65-3.80(m, 1H), 4.58(br d, 1H), 4.65(br q, 1H), 5.10(s, 2H), 5.63(d, 1H, J=7.5Hz), 6.98(br s), 7.31-7.36(br s, 5H)。

【0038】 (f) 化合物1-6の合成

化合物1-5、4.950gにメタノール80m1を加えて溶かした。ここに10%Pd-C(dry)0.204gを加え、常圧水素雰囲気下で2時間攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を減圧下留去して無色粘稠の油状物3.855gを得た。

【0039】 NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=6.8Hz), 1.12(s, 9H), 1.25(brs, 30H), 1.55-1.60(m, 2H), 1.86-2.18(m, 3H), 2.23-2.32(m, 1H), 3.29-3.38(m, 1H), 3.42-3.65(m, 15H), 3.73-3.82(m, 2H), 4.58(dd, 1H, J=2.8Hz, 8.3Hz), 4.80(dd, 1H, J=2.3Hz, 8.8Hz), 7.02(br s, 1H)。

【0040】 (g) 化合物1-7の合成

N-ベンジルオキシカルボニル- $\beta$ -t-ブチルアスパラギン酸一水和物2.255gにベンゼンおよびTHFを加えて溶かし、溶媒を減圧下留去した。残渣に再びベンゼンを加えて溶かし、溶媒を減圧下留去した。ここに化合物1-6、3.855g及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール0.974gをDMF30m1に溶かしたものをお加え、氷冷下攪拌した。ここにDCC1.425gを加え、そのまま12.5時間攪拌した。生じた沈殿を濾去し、溶媒を減圧下留去し、残渣を酢酸エチルに溶かし、10%クエン酸、10%炭酸ナトリウム及び飽和食塩水でこの順に洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し(塩化メチレン→塩化メチレン:メタノール100:1~50:1)、無色粘稠の油状物5.056gを得た。

【0041】  $[\alpha]_D^{22} = -29.0^\circ$  (c=1.04, EtOH)。

NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=7.0Hz), 1.17(s, 9H), 1.25(brs, 30H), 1.43(s, 9H), 1.54-1.57(m, 2H), 1.94-2.04(m, 3H), 2.24-2.29(m, 1H), 2.60

(dd, 2H, J=5.8Hz, 16.8Hz), 2.94(dd, 1H, J=5.3Hz, 16.8Hz), 3.28-3.37(m, 1H), 3.41-3.67(m, 16H), 3.86-3.89(m, 1H), 4.52-4.58(m, 2H), 4.79-4.83(m, 1H), 5.11(d, 1H, J=12.0Hz), 5.15(d, 1H, J=12.0Hz), 5.91(d, 1H, J=9.0Hz), 6.96(t, 1H, J=5.5Hz), 7.18(d, 1H, J=9.0Hz), 7.31-7.38(m, 5H)。

## 【0042】(h) 化合物1-8の合成

化合物1-7、4.936gにメタノール100mlを加えて溶かした。ここに10%Pd-C(dry)0.210gを加え、常圧水素雰囲気下で2時間攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を減圧下に留去して無色粘稠の油状物4.060gを得た。

【0043】NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=7.0Hz), 1.18(s, 9H), 1.25(brs, 30H), 1.45(s, 9H), 1.54-1.60(m, 2H), 1.87-2.04(m, 3H), 2.26-2.30(m, 1H), 2.52(dd, 2H, J=8.5Hz, 16.5Hz), 2.81(dd, 1H, J=3.5Hz, 16.5Hz), 3.24-3.36(m, 1H), 3.42-3.68(m, 16H), 3.86-3.90(m, 1H), 4.45-4.50(m, 0.2H), 4.57-4.59(br d, 0.8H), 4.82-4.87(m, 2H), 7.00(br d, 1H), 7.86(d, 0.2H, J=6.0Hz), 8.01(d, 0.8H, J=8.0Hz)。

## 【0044】(i) 化合物1-9の合成

N-ベンジルオキシカルボニルグリシン1.251g、化合物1-8、4.053g及び1-ヒドロキシベンソトリアゾール0.876gをDMF25mlに溶かし、氷冷下攪拌した。ここにDCC1.286gを加え、そのまま13.5時間攪拌した。生じた沈殿を濾去し、溶媒を減圧下留去し、残渣を酢酸エチルに溶かし、10%クエン酸、10%炭酸ナトリウム及び飽和食塩水でこの順に洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し(塩化メチレン-塩化メチレン:メタノール100:1~30:1)、無色粘稠の油状物4.611gを得た。

【0045】 $[\alpha]_D^{22} = -30.3^\circ$  (c=1.0, EtOH)。

NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=6.8Hz), 1.17(s, 9H), 1.25(brs, 30H), 1.44(s, 9H), 1.53-1.59(m, 2H), 1.87-2.04(m, 3H), 2.22-2.29(m, 1H), 2.54-2.64(m, 2H), 2.83-2.96(m, 1H), 3.25-3.32(m, 1H), 3.43-3.65(m, 16H), 3.84-3.99(m, 3H), 4.35-4.40(m, 0.2H), 4.54-4.56(br d, 0.8H), 4.77-4.81(br q, 2H), 5.11-5.17(br q, 2H), 5.65(br s, 0.8H), 5.79(br s, 0.2H), 6.97(br t, 1H), 7.18-7.25(m, 2H), 7.30-7.38(m, 5H)。

## 【0046】(j) 化合物1-10の合成

化合物1-9、4.493gにメタノール120mlを加えて溶かした。ここに10%Pd-C(dry)0.210gを加え、常圧水素雰囲気下で2時間攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を減圧下留去して無色粘稠の油状物

3.951gを得た。

## 【0047】(k) 化合物1-11の合成

N-ベンジルオキシカルボニルN'-4-メトキシ-2,3,5-トリメチルベンゼルスルホニルアルギニンシクロヘキシルアミン塩19.95gを酢酸エチル350mlに懸濁させた。ここに0.1N硫酸200mlを加え、激しく攪拌し、結晶が溶解したら有機層を分離し、水層を酢酸エチル抽出した。抽出液は合わせて飽和食塩水で洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させ、溶媒を減圧下留去して無色非晶質物18.27gを得た。これをメタノール300mlに溶かし、ここに10%Pd-C(dry)1.500gを加え、常圧水素雰囲気下で3時間攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を減圧下留去して無色粘稠の油状物10.31gを得た。

## 【0048】(l) 化合物1-12の合成

化合物1-11、10.31gに蒸留水20ml及びトリエチルアミン(TEA)7.44mlを加えて溶かした。これを氷冷下攪拌し、ここにt-ブチルS-4,6-ジメチルピリミジン-2-イルーチオカーボネート(Boc-S)7.05gを1,4-ジオキサンに溶かして加えた。

【0049】室温で14時間攪拌し、蒸留水で全量が約500mlとなるよう希釈し、酢酸エチルで2回洗浄した。氷冷し、10%クエン酸でpH=3として酢酸エチルで抽出した。有機層を氷冷した1N塩酸(3回)及び飽和食塩水で洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させ、溶媒を減圧下留去して無色非晶質物13.24gを得た。

【0050】NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 1.43(s, 9H), 1.63(br s, 2H), 1.74(br s, 1H), 1.87(br s, 1H), 2.12(s, 3H), 2.57(s, 3H), 2.66(s, 3H), 3.23(br s, 2H), 3.83(s, 3H), 4.25(br s, 1H), 5.61(br d, 1H), 6.2-6.5(br s, 3H), 6.53(s, 1H)。

## 【0051】(m) 化合物1-13の合成

化合物1-12、0.690g、化合物1-10、1.028g及び1-ヒドロキシベンソトリアゾール0.208gをDMF10mlに溶かし、氷冷下攪拌した。ここにDCC0.305gを加え、そのまま14時間攪拌した。生じた沈殿を濾去し、溶媒を減圧下留去し、残渣を酢酸エチルに溶かし、10%クエン酸、10%炭酸ナトリウム及び飽和食塩水でこの順に洗い、硫酸マグネシウム上乾燥させ、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し(塩化メチレン:メタノール100:1~30:1)、無色非晶質物1.234gを得た。

【0052】 $[\alpha]_D^{22} = -24.3^\circ$  (c=1.0, EtOH)。

FAB-MS: [M+H]<sup>+</sup>; m/z = 1338.

NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>) : 0.88(t, 3H, J=6.8Hz), 1.15(s, 9H), 1.25(brs, 30H), 1.43(s, 9H), 1.44(s, 9H), 1.52-1.67(m, 4H), 1.67-1.79(m, 1H), 1.82-2.25

11

(m, 4H), 2.12(s, 3H), 2.63(s, 3H), 2.60-2.69(m, 1H), 2.70(s, 3H), 2.82-2.96(br q, 1H), 3.22-3.28(m, 3H), 3.43-3.65(m, 17H), 3.82(s, 3H), 3.81-3.88(m, 3H), 3.98-4.05(br q, 1H), 4.20-4.28(br s, 1H), 4.35-4.42(m, 0.2H), 4.43-4.47(br d, 0.8H), 4.73-4.78(br s, 2H), 5.78(br d, 1H), 6.35(br s, 1H), 6.39(br s, 2H), 6.52(s, 1H), 6.93(br s, 1H), 7.23-7.32(m, 1H), 7.39-7.48(m, 2H)。

## 【0053】(n) 化合物1-14の合成

化合物1-13、0.4958gにアニソール1mlを\*10

## (分析条件)

カラム: YMC AM-302 (ODS)

流速: 1.0 ml/min

波長: 210 nm

測定レンジ: 0.04 AUFS

溶出液: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-TFA 700:300:0.65 (v/v)

## (分取条件)

カラム: YMC SH-343-5 (ODS)

流速: 10.0 ml/min

波長: 210 nm

測定レンジ: 0.64 AUFS

溶出液: 1) 0.015% HCl

2) CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-20%HCl

100:900:0.75 (v/v)

→CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-20%HCl

100:900:0.75 (v/v) グラジェント

※1.

## 【0055】得られたフラクション中のアセトニトリル

を減圧留去し、さらに2回凍結乾燥して目的化合物を無色非晶質として0.2114gを得た。

【0056】 $[\alpha]_D^{25} = -27.7^\circ$  (c=1.0  
5, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O 10:10:  
3).FAB-MS: [M+H]<sup>+</sup>; m/z=914. 40 【0058】

アミノ酸分析: Asp, 1.00; Ser, 0.93;

Pro, 1.01; Gly, 0.99; Arg, 1.0\*

Palmitoyl-(Arg-Gly-Asp-Ser-Pro)<sub>2</sub>-OH·2HCl

【0059】すなわち、目的化合物はBoc法(Boc strategy)に基いて固相法によりペプチド鎖部分を合成した。使用した固相合成機は、アブライド・バイオシステム社の「モデル430A」である。N-末端のアシル化体については、固相法で合成したレジンのN-末端をフリードした後、活性エステル法により行なった。脱保護

50

はHFにより行ない、得られた粗生成物はHPLCにより精製した。なお、HF脱保護装置としては、ペプチド研究所の「HF-Reaction Apparatus Type IV」を使用した。以下、詳述する。

【0060】固相合成機により下記のレジンを合成した。合成は0.5mmolスケールで行ない、1.200g

12

\*加え、冰凍した。ここに冰凍したTFA 10mlを加え、そのまま6時間攪拌し、さらに室温で18.5時間攪拌した。溶媒を減圧下に留去し、残渣にジエチルエーテル及びn-ヘキサンを加えて遠心分離(3000 rpm, 10分)した。上清を除き、沈殿物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製した。分析条件及び分取条件は下記の通りである。

## 【0054】

## 【表1】

のレジンを得た。

【0061】

\* 【化6】

\*

Boc-[Arg(Tos)-Gly-Asp(BzI)-Ser(BzI)-Pro]₂-OCH<sub>2</sub>PAM resin

ここで、PAM resin は 4-(オキシメチル) フェニル  
アセトアミド樹脂を意味する。

【0062】こうして得たレジン全量に 50% (V/V) TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 40ml を加え、開放して 1 分間、さらに栓をして 15 分間攪拌し、レジンを濾取した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOH 及び CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> でこの順で 2 回ずつ洗い、減圧乾燥した。回収したレジンに DMF を加えて空素をバブルさせた後、DMF を濾去した(3回)。次いで、10% ジイソプロピルエチルアミン(DIEA) - DMF を加え、1 分間空素をバブルさせた後、DIEA-DMF を濾去した(2回)。さらに DMF 及び CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> でこの順に 2 回ずつ洗い、減圧乾燥した。得られたレジンを DMF 4ml と CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10ml との混合物に懸濁させ、パルミチン酸スクシンイミドエステル(palmitoyl-OSu) 1.768g を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 〔表2〕

(分析条件)

溶出液: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-TFA 500:500:0.65

カラム: YMC AM-302 (ODS)

流速: 1.0 ml/min

測定レンジ: 0.04 AUFS

波長: 210 nm

(分取条件)

溶出液: 0.015% HCl → CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-20% HCl  
450:550:0.75 段階的グラジェント

カラム: YMC SH-343-5 (ODS)

流速: 10.0 ml/min

測定レンジ: 0.64 AUFS

波長: 210 nm

【0065】なお、このようにして合成した RGDペプチド-脂質導体(palmitoyl-(RGDSP)<sub>2</sub>-OH·2HCl)について、質量分析計「JEOL HX-100」及び旋光度計「Parkin-Elmer 430」を用いて質量スペクトル及び比旋光度をそれぞれ測定した結果は次の通りであった。

【0066】FAB-MS: [M+H]<sup>+</sup>, m/z: 1282.

[\alpha]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -66.0° (c=1.01, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O 10:10:3)。

【0067】実施例3 (RGDペプチド-脂質導体の

※ C<sub>12</sub> 10ml に溶かして加え、室温で 5 日間攪拌した。レジンを濾取し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、MeOH 及び CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> でこの順で 2 回ずつ洗い、減圧乾燥し、レジン 0.939g を得た。

【0068】ここにアソール 940 μl を加え、HF 約 30ml で脱保護した(0°C、2時間)。n-ヘキサンを加えて上清を捨て(2回)、蒸留水に溶かしてオルガノ社製イオン交換樹脂「Amberlite IRA-93ZU」(AcOH型)を加えて pH=4 とし、樹脂を濾去した。濾液を凍結乾燥し、残渣を HPLC により下記条件で精製した。

【0064】

【表2】

40 合成(その3)

本実施例においては、コレステロール脂質がカルボニル基を介して RGDペプチドと結合した形の RGDペプチド-脂質導体 (Cho1-CO-RGDペプチド、ここに Cho1 はコレステリル残基を表わす。) をいくつか合成した。

【0068】Cho1-CO-RGDペプチドの合成の概略は、次の通りである。

【0069】(1) ペプチドの合成

自動化ポリペプチド合成機「Model 430A」(アプライド・バイオシステムズ社製)を用いて、同社

15

の標準操作手順 (t-Boc 法、0.5 mmol スケール) に準拠して固相合成した。固相からのペプチドの切断は、トリフルオロメタンスルホン酸 (TFMSA) / トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いる同社標準操作手順に従い、得られた粗ペプチド (RGD ペプチド) はメタノールまたはエタノールに溶解後ジエチルエーテル (エーテル) により粉末として、次の 3-コレステリルカルボニル化反応 (Chol-CO 化) に供した。

【0070】(2) ペプチド N-末端の Chol-CO 化

上記粗ペプチドとその 1.0 ~ 1.5 倍モルの活性エステル N-[3-コレステリル] カルボニルオキシ] スクシンイミド (Chol-CO-Osu) を、過剰量の炭酸水素ナトリウム存在下、クロロホルム、メタノール及び蒸留水の 8 : 10 : 3 の混合溶媒中にて室温で搅拌した。

【0071】この反応の過程は下記の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にてチェックした。簡潔に記すと、反応液約 50 μl を小試験管に採取し、ドライアイにて加熱、送風して内容物の溶媒を留去してアメ状とし、これに HPLC グラジェント初期溶離液を約 100 μl 加えて溶解した。その一部 (20 ~ 30 μl) を定性分析用の HPLC システムに注入し、分析した。

【0072】(3) HPLC による定性分析および分取精製

「Model 150A Separation System」 (アプライド・バイオシステムズ社製) を用い、214 nm の紫外外部吸収にて検出した。

【0073】(定性分析) C-8 タイプの逆相系カラム (「Aquapore RP-300」、ボアサイズ 30 nm、7 μm 球状オクチルシリル化シリカゲル、4.6 mmφ × 220 mm、アプライド・バイオシステムズ社製) を用い、流速 1.0 ml/min、0.1% TFA を含むアセトニトリル水溶液のアセトニトリル濃度を 10 分間に 10% から 80% まで直線的に増加させ、さらに引き続き 80% アセトニトリル水溶液にて 10 分間溶出するグラジェントプログラムを適用した。

【0074】(分取、精製) C-8 タイプの逆相カラム (「Aquapore Prep-10」、ボアサイズ 30 nm、20 μm 球状オクチルシリル化シリカゲル、10 mmφ × 25 mm、アプライド・バイオシステムズ社製) を用いた。Chol-CO-RGD ペプチドの精製は、0.05 または 0.1% TFA を含むアセトニトリルのリニアグラジェント (15 分間に 10 → 90%、流速 6.0 ml/min) により行なった。

【0075】(4) <sup>1</sup>H-NMR 測定方法

各試料は 4 ~ 5 mg/ml の濃度の溶液に調製し、これに TFA を 1 滴加えて試料溶液とした。この溶液を 「Varian VXR-500S」 (500 MHz、Varian 社製) にて測定した。

16

【0076】(5) H-(RGDSP)-OH の調製  
実施例 2 におけると同様にして合成したレジン、すなわち官能基が保護された (Arg-Gly-Asp-Ser-Pro)<sub>2</sub> が結合している固相 2.41 g (0.92 mmol) を 100 ml ナス形コルベンに入れ (なるべく器壁に付着しないように)、さらにチオアニソール 2.5 ml およびエタンジオール 1.2 ml をそれぞれ加え、室温で 10 分間放置した。これに TFA 20 ml を氷冷下に加え、室温で 10 分間搅拌した。これを再び冷却し、TFMSA 3 g 滴加し、室温で 45 分間搅拌した。この反応液にエーテルを氷冷下加えてその全量を約 100 ml とし、固相および白色析出物をグラスフィルター (G3) にて濾取した。

【0077】これをエーテルにて数回洗浄し、さらに吸引にてエーテルをできるかぎり除去した。エーテル 500 ml を入れたビーカーの液面上にこのグラスフィルターを装着し、ビーカー内を搅拌しながらグラスフィルター中に TFA 5 ml を加えて可溶物を溶出させ、エーテル中に白色析出物を得た。この操作を当該析出物が得られなくなるまで繰返した。得られた白色析出物をグラスフィルター (G4) にて濾取し、エタノールにて可溶物を溶出させた。この溶出液を約 5 ml まで減圧下濃縮し、これをエーテル 300 ml 中に搅拌しながら滴加した。得られた白色析出物をグラスフィルター (G4) にて濾取し、エーテルにて数回洗浄した。この析出物を、エーテルで湿った状態でサンプル瓶中に入れ、減圧下乾燥した。収量 1.11 g。

【0078】他の RGD ペプチドについても、上記同様の処理 (アプライド・バイオシステムズ社標準操作手順) にて固相より切断した。

【0079】以下、本発明の RGD ペプチド-脂質誘導体の具体的合成例を掲げる。

【0080】(a) Chol-CO-GRGDSP-OH の合成 (H-GRGDSP-OH の Chol-CO 化) : H-GRGDSP-OH (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro) 0.59 g (1.0 mmol) を脱イオン水 8 ml およびメタノール 28 ml の混合液に溶解させ、過剰量の炭酸水素ナトリウムを加えた。この溶液に Chol-CO-Osu 0.60 g (1.1 mmol) およびクロロホルム 24 ml それぞれ加えて室温にて搅拌した。3 時間後、HPLC にて H-GRGDSP-OH の消失を確認した。

【0081】4.5 時間後に反応液を減圧下濃縮し、エタノールを加えてさらに数回濃縮を繰返した後、これにクロロホルムを加え、減圧下濃縮して乾固させた。得られた残渣にエーテル約 50 ml 加えて固化させた。得られた白色の不溶物を濾取し、10% メタノール水溶液 30 ml に溶解し、この液を一旦 1 N 水酸化ナトリウム水溶液にて pH 約 1.0 とし、引き続き 1 N 塩酸にて pH 4 とすると白色析出物が得られた。これにメタノール 10

0 m l を加えると白色析出物はさらに増加し、これを静置すると同析出物はコルペンの内壁に付着した。この液を捨ててメタノール 50 m l を加えて得られた析出物を固化させ、白色粉末を濾取して減圧下乾燥した。この一部を 10% メタノール水溶液に溶解させて、分取用 HPLC にて精製した。回収した溶出液は減圧濃縮し、エタノールを加えて再度約 5 m l にまで減圧濃縮し、メタノール約 20 m l および 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 5~6 として静置した。得られた白色析出物を濾取し、減圧乾燥した。収量は 341 mg。

【0082】<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) : δ 5.37(1H, broad d), 4.7~4.9(2H, m), 4.3~4.5(3H, m), 3.6~3.9(8H, m), 3.20(1H, t), 2.80(1H, dd), 2.74(1H, dd), 2.32(2H, d), 2.25(1H, m), 2.1~1.8(9H, m), 1.8~0.8(36H, m), 0.71(3H, s)。

【0083】(b) Chol-CO-(RGDSP)<sub>2</sub>-OH の合成 (H-(RGDSP)<sub>2</sub>-OH の Chol-CO<sup>-</sup>化) : H-(RGDSP)<sub>2</sub>-OH (Arg-Gly-Ala-Ser-Pro) 1.00 g (0.96 mmol) を脱イオン水 6 m l およびメタノール 10 m l の混合液に溶解させ、泡が出なくなるまで炭酸水素ナトリウムを加えてさらにこれを 100 mg 追加した。これにメタノール 10 m l を追加して、Chol-CO-Osu 370 mg (0.70 mmol) およびクロロホルム 15 m l をそれぞれ加えて室温にて攪拌した。5時間後、薄層クロマトグラフィー (TLC) にて Chol-CO-Osu の消失を確認した。

【0084】反応液を減圧下濃縮し、エタノールを加えてさらに数回濃縮を繰返した後これにクロロホルムを加え、減圧下濃縮して乾固させた。得られた残渣にエーテル約 50 m l 加えて固化させた。得られた淡黄色の不溶物を濾取し、10% メタノール水溶液 30 m l に溶解させ、この液を 1 N 塩酸にて pH 5 とすると白色析出物が得られた。これにメタノール 40 m l を加えると白色析出物はさらに増加し、これを静置すると同析出物はコルペンの内壁に付着した。この液を捨ててメタノール 30 m l を加えて得られた析出物を固化させ、白色粉末を濾取して減圧下乾燥した。この一部を 10% メタノール水溶液に溶解させて分取用 HPLC にて精製した。回収した溶出液は減圧濃縮し、エタノールを加えて再度約 5 m l にまで減圧濃縮し、メタノール約 20 m l および 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 5~6 として静置した。得られた白色析出物を濾取し、減圧乾燥した。収量は 204 mg。

【0085】<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) : δ 5.37(1H, broad d), 5.0~4.7(m), 4.4~4.5(3H, m), 4.33(1H, m), 4.07(1H, m), 3.9~3.7(12H, m), 3.20(4H, m), 2.9~2.7(4H, m), 2.4~2.2(4H, m), 2.1~1.8(13H, m), 1.8~0.87(39H, m), 0.71(3H, s)。

【0086】(c) Chol-CO-(RGDSP)<sub>2</sub>

-NH<sub>2</sub> の合成 (H-(RGDSP)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> の Chol-CO<sup>-</sup>化) : H-(RGDSP)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (Arg-Gly-Ala-Ser-Pro-NH<sub>2</sub>) 0.80 g (0.77 mmol) を脱イオン水 10 m l およびメタノール 30 m l の混合液に溶解させ、トリエチルアミンを加えて pH 約 9 とした。この溶液に Chol-CO-Osu 0.50 g (0.95 mmol) およびクロロホルム 20 m l をそれぞれ加えて室温にて攪拌した。6時間後、HPLC にて H-(RGDSP)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> の消失を確認した。

【0087】反応液を減圧下濃縮し、エタノールを加えてさらに数回濃縮を繰返した後、これにクロロホルムを加え、減圧下濃縮して乾固させた。得られた残渣にエーテル約 50 m l 加えて固化させた。得られた白色の不溶物を濾取し、10% メタノール水溶液 30 m l に溶解させ、この液を 1 N 塩酸にて pH 5 とすると白色析出物が得られた。これにメタノール 40 m l を加えると白色析出物はさらに増加し、これを静置すると同析出物はコルペンの内壁に付着した。この液を捨ててメタノール 20 m l を加えて得られた析出物を固化させ、白色粉末を濾取して減圧下乾燥した。この一部を 10% メタノール水溶液に溶解させて分取用 HPLC にて精製した。回収した溶出液は減圧濃縮し、エタノールを加えて再度約 5 m l にまで減圧濃縮し、メタノール約 20 m l および 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 5~6 として静置した。得られた白色析出物を濾取し、減圧乾燥した。収量は 204 mg。

【0088】<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) : δ 5.39(1H, broad d), 4.8(4H, m), 4.4~4.5(3H, m), 4.35(1H, m), 4.08(1H, m), 3.9~3.7(12H, m), 3.21(4H, m), 2.89(2H, m), 2.76(4H, m), 2.4~2.2(4H, m), 2.2~1.8(13H, m), 1.8~0.86(39H, m), 0.71(3H, s)。

【0089】(d) Chol-CO-(RGD)<sub>3</sub>-OH の合成 (H-(RGD)<sub>3</sub>-OH の Chol-CO<sup>-</sup>化) : H-(RGD)<sub>3</sub>-OH 1.00 g (1.0 mmol) を脱イオン水 5 m l およびメタノール 5 m l の混合液に溶解させ、過剰量の炭酸水素ナトリウムを加えた。この溶液に Chol-CO-Osu 0.40 g (0.76 mmol) およびクロロホルム 10 m l をそれぞれ加えて室温にて攪拌した。6時間後、HPLC にて Chol-CO-Osu の消失を確認した。

【0090】反応液を減圧下濃縮し、エタノールを加えてさらに数回濃縮を繰返した後、これにクロロホルムを加え、減圧下濃縮してアメ状とした。得られた残渣にエーテル約 50 m l 加えて固化させた。得られた白色の不溶物を濾取し、10% メタノール水溶液 30 m l に溶解させ、この液を一旦 1 N 水酸化ナトリウム水溶液にて pH 約 1.0 とし、引き続き 1 N 塩酸にて pH 5 とすると白色析出物が得られた。これにメタノール 30 m l を加えると白色析出物はさらに増加し、これを静置すると同析出

19

物はコルベンの内壁に付着した。この液を捨ててメタノール20mlを加えて得られた析出物を固化させ、白色粉末を濾取して減圧下乾燥した。この一部を10%メタノール水溶液に溶解して、分取用HPLCにて精製した。回収した溶出液は減圧濃縮し、エタノールを加えて再度約5mlにまで減圧濃縮し、メタノール約20mlおよび1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH5~6として静置した。得られた白色析出物を濾取し、減圧乾燥した。収量は731mg。

【0091】<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) : δ 5.37(1H, broad d), 4.75(2H, m), 4.4~4.2(3H, m), 4.12(1H, t), 4.0~3.8(6H, m), 3.19(6H, m), 2.9~2.7(6H, m), 2.31(2H, broad d), 2.1~0.8(51H, m), 0.71(3H, s).

【0092】(e) Cho1-CO-GGGRGDSP-OHの合成(H-GGGRGDSP-OHのCho1-CO化) : H-GGGRGDSP-OH (Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro) 0.85g (1.21mmol) を脱イオン水5mlおよびメタノール5mlの混合液に溶解させ、過剰量の炭酸水素ナトリウムを加えた。この溶液にCho1-CO-OSu 0.42g (0.80mmol) およびクロロホルム10mlをそれぞれ加えて室温にて攪拌した。6時間後、HPLCにてCho1-CO-OSuの消失を確認した。

【0093】反応液を減圧下濃縮し、エタノールを加えてさらに数回濃縮を繰返した後、これにクロロホルムを加え、減圧下濃縮してアメ状とした。得られた残渣にエーテル約50ml加えて固化させた。得られた白色の不溶物を濾取し、10%メタノール水溶液30mlに溶解し、この液を一旦1N水酸化ナトリウム水溶液にて約pH10とし、引き続き1N塩酸にてpH5とすると白色析出物が得られた。これにメタノール30mlを加えると白色析出物はさらに増加し、これを静置すると同析出物はコルベンの内壁に付着した。この液を捨ててメタノール20mlを加えて得られた析出物を固化させ、白色粉末を濾取して減圧下乾燥した。この一部を10%メタノール水溶液に溶解し、分取用HPLCにて精製した。回収した溶出液は減圧濃縮し、エタノールを加えて再度約5mlにまで減圧濃縮し、メタノール約20mlおよび1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH5~6として静置した。得られた白色析出物を濾取し、減圧乾燥した。収量は423mg。

【0094】<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) : δ 5.37(1H, broad d), 4.8~4.7(2H, m), 4.0~3.7(12H, m), 3.19(2H, t), 2.9~2.7(2H, m), 2.32(2H, d), 2.26(1H, m), 2.1~1.7(9H, m), 1.7~1.8(36H, m), 0.71(3H, s).

【0095】実施例4(リポソームの調製、細胞接着阻害実験)

本実施例の実験は、Pierschbacher, M.D., et al., Nature, 309, 30(1984)に記載の方法に準じて行なった。す

10

20

30

40

20

なわち、エライザ(ELISA)用96穴マイクロプレートをフィプロネクチンでコーディングし、ウシ血清アルブミン(BSA)でブロッキングした。検体を分注し、トリプシン処理にて調製したマウス肺癌細胞株3L(L(Saiki, I., et al., Br. J. Cancer, 59, 194(1989)参照)を4×10<sup>4</sup>個加え、37℃で40分間インキュベートした。非接着細胞を除去した後、接着細胞に3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT)を添加して発色させ、吸光度から細胞接着率を算出した。

【0096】なお、検体としては、本発明のペプチド修飾リポソーム及びコントロールとしての遊離のペプチド(RGDペプチドそのもの)の計2点を使用した。

【0097】ここに、本発明のペプチド修飾リポソームは、L-α-ジバルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)、コレステロール(CHOL)、ジセチルリン酸(DCP)及び本発明の物質である実施例2の方法で合成されたRGDペプチド-脂質誘導体(脂質(アンカー)がアルキル基)がそれぞれ5.8, 7.2mg, 30.94mg, 4.38mg及び10.95mgの脂質組成を有する。製造法としては、これらを50mlの遠沈管にとり、クロロホルムおよびメタノールの混液(容積比1:1)に溶かし、次に、窒素ガス気流中で有機溶媒を除去して遠沈管のガラス壁にリピッドフィルムを生成させた。一晩デシケータ内で減圧乾燥後、これに予め約45℃に加温したリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)8mlを加えて約50℃に保温しながら振盪し、更に軽く超音波処理してリポソームの懸濁液を調製した。これを60℃に加温し、0.2μm, 0.1μm, 0.08μmの孔径を有するポリカーボネートメンブランフィルターを順に通過させ、粒径約0.1μmのリポソームの懸濁液を調製した。

【0098】一方、遊離のペプチドは、実施例3の(5)の方法で合成されたRGDSPRGDSPで、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)の溶液にして供試した。

【0099】結果を図1に示す。この図より、本発明のペプチド修飾リポソームのほうがより低濃度で3L細胞の、フィプロネクチンへの接着阻害効果を示すことが判る。なお、図1において、横軸のペプチド濃度は、本発明のペプチド修飾リポソームについて本発明のRGDペプチド-脂質誘導体としての濃度である。

【0100】実施例5(リポソームの調製)

本発明のペプチド修飾リポソームを次のようにして調製した。すなわち、DPPC、CHOL、DCP及び本発明の物質であるRGDペプチド-脂質誘導体(実施例3の(b)の方法で合成されたもの、脂質(アンカー)はコレステリル基)をそれぞれ3.6, 7mg, 1.9, 4mg, 2.75mg及び14.5mg(10:10:1:2の割合(モル比))秤取し、これらを50ml遠沈管

21

にとり、これにクロロホルム及びメタノールの1:1混液を加えて溶解した。次に、40~50°Cの水浴中で窒素ガスを用いて溶媒を除去してリピッドフィルムを調製した。一晩デシケータ内に保存後、これにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)5mlを加え、40~50°Cでポルテックス・ソニケーションを行ない、エクストルーダーを用いて0.2μm、0.1μm及び0.08μmのフィルターで逐次通過し、リポソームを調製した。粒子径161.2nm、ゼータ電位-28.18mV。

【0101】一方、コントロールのリポソームを次のようにして調製した。すなわち、本発明の物質であるRG

22

Dペプチド-脂質誘導体は全く使用せずにDPPC、CHOL及びDCPをそれぞれ上記と同量を秤取し、以下全く同様にしてリポソームを調製した。粒子径150.8nm、ゼータ電位-17.95mV。

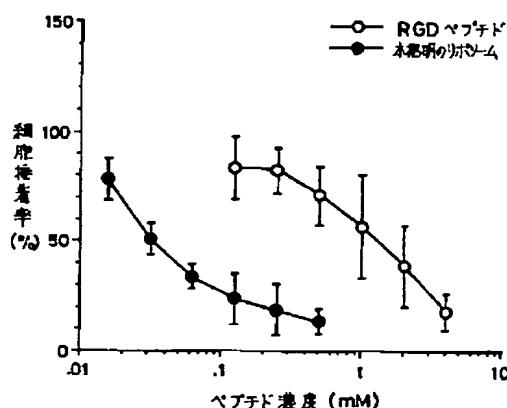
## 【0102】

【発明の効果】本発明により、リポソームに含有せしめられたときに癌細胞の転移を有効に抑制する物質が容易に提供されるところとなった。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例4における実験結果を示す。

【図1】




---

フロントページの続き

(72)発明者 加藤 隆  
茨城県つくば市船荷前9-7

(72)発明者 金子 英雄

神奈川県横浜市南区中村町1-1-25

(72)発明者 田中 熊  
茨城県つくば市二の宮2-5-16